

# Platelet signaling to procoagulant activity and heterogeneity in thrombus formation : an in vivo and ex vivo approach

Citation for published version (APA):

Munnix, I. C. A. (2007). *Platelet signaling to procoagulant activity and heterogeneity in thrombus formation : an in vivo and ex vivo approach*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20070615im>

## Document status and date:

Published: 01/01/2007

## DOI:

[10.26481/dis.20070615im](https://doi.org/10.26481/dis.20070615im)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# Summary

Intravascular thrombosis is classified as venous thrombosis (e.g., in deep veins) or arterial thrombosis (as in myocardial infarction and ischemic stroke). Irrespective of other factors (vessel wall, circulation and blood cell composition), venous thrombosis is commonly associated with high coagulation activity, which can cause undesired fibrin clot deposition. On the other hand, arterial thrombosis is often linked to high platelet activation, which leads to the formation of platelet-rich thrombi. Although nowadays there are good examples of favorable combination therapy with anticoagulant and antiplatelet drugs, anticoagulants are still preferred in reducing venous thromboembolism while antiplatelet agents are mostly used in the prevention of arterial thrombosis. Irrespective of this, laboratory investigations indicate that the processes of platelet activation and coagulation are strongly mutually dependent. The crucial coagulation product, thrombin, is one of the most potent platelet agonists known. Conversely, activated platelets are essential in providing the procoagulant surface at which thrombin generation occurs. This is in apparent contrast with the supposed differential roles of thrombin and activated platelets in venous and arterial thrombosis, respectively. Hence, the main goal of this thesis is to investigate the diversity in interaction mechanisms between platelet activation and coagulation in different situations and on different levels of complexity.

Platelets can be activated by complex cascades of signaling pathways. Current knowledge of a number of these pathways is described in **chapter 1**. Emphasised is how the ADP receptor, P2Y<sub>12</sub>, the thrombin receptors, PAR1 and PAR4, and the collagen receptor, glycoprotein (GP)VI, activate the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway by producing phosphoinositide 3,4,5-trisphosphate. Particularly, PI3K that is activated downstream of GPVI plays a role in recruiting phospholipase C- $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) to the plasma membrane. Activation of PLC $\gamma$ 2 leads to Ca<sup>2+</sup> elevation by mobilisation of Ca<sup>2+</sup> from internal stores, and subsequent secretion and exposure of phosphatidylserine (PS) at the platelet surface. Earlier literature is cited that PS-exposing platelets are active in thrombin generation and coagulation, by providing a surface at which coagulation factors assemble. Separately, P2Y<sub>12</sub> and PAR receptor stimulation activates the so-called Rap1b, PI3K and Akt pathway, which leads to integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation and hence platelet aggregation.

The rare Scott syndrome is a bleeding disorder, characterized by impaired surface exposure of procoagulant PS on activated platelets and other blood cells. Since store-mediated Ca<sup>2+</sup> entry is essential for the procoagulant response of platelets, we investigated in **chapter 2** whether the Ca<sup>2+</sup> entry process is impaired in blood cells from Scott patients. Measurements of Ca<sup>2+</sup> fluxes and PS exposure were performed in isolated platelets and in immortalized B-cell lymphoblasts from two different patients. The

responses of platelets and B-cells from the Scott patients appeared to be unaltered in comparison to cells from control subjects. On the other hand, the extent of PS exposure in response to GPVI stimulation was strongly reduced in patient platelets. These results thus indicate that impaired phospholipid scrambling in Scott cells can not be ascribed to alterations in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, e.g. of diminished  $\text{Ca}^{2+}$  entry.

Inositol phospholipids, especially those produced by PI3K, play key roles in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in platelets. **Chapter 3** describes a study on the role of various platelet PI3K isoforms in the regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, following platelet activation by collagen or thrombin. Mice lacking the  $\text{p85}\alpha$  regulatory subunit (class 1A PI3K) or the  $\text{p110}\gamma$  catalytic subunit (class 1B PI3K $\gamma$ ) were used, as well as several newly developed inhibitors interacting with the catalytic subunits of the various PI3Ks present in platelets. The results indicate that both the  $\text{p85}\alpha$  regulatory subunit and the catalytic  $\text{p110}\beta$  activity contribute significantly to  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and subsequent PS exposure elicited by collagen receptor activation. This contribution occurs via the classical  $\text{Ca}^{2+}$  pathway, i.e. by enhancing the PLC-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisation and subsequent store-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  entry. The class 1A PI3K $\delta$  and the class 1B PI3K $\gamma$  isoforms do not seem to have a prominent role in this process.

In the *in vitro* flow studies reported in **chapter 4**, the interacting roles of the platelet adhesive receptors for von Willebrand factor (vWF), i.e. GPIb-V-IX and integrin  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ , and for collagen, i.e. GPVI and integrin  $\alpha 2\beta 1$ , were examined. Studies were performed to measure thrombus formation and procoagulant activity during high-shear perfusion of human whole blood over a collagen surface. Novel antibodies and peptides directed against the two collagen receptors were used to specifically unravel the function of each receptor molecule. GPVI was found to be crucial for platelet aggregate formation,  $\text{Ca}^{2+}$  signaling and PS exposure, but not for primary adhesion to collagen/vWF. Inhibition of  $\alpha 2\beta 1$  revealed that this integrin had a modulating role in  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, PS exposure and aggregate size, since it enforced the responses evoked by GPVI. Interestingly, both GPIb-V-IX and  $\alpha 2\beta 1$  contributed to primary adhesion, and showed a partly overlapping function. Co-inhibition studies revealed synergism of distinct platelet receptors in thrombus formation. Co-inhibition of ADP with collagen receptors resulted in greatly decreased adhesion and aggregation. Co-inhibition of GPVI with either GPIb $\alpha$  or  $\alpha 2\beta 1$  was required to cause complete eradication of thrombus formation. It was concluded that platelet deposition on collagen depends on the concerted interplay of several receptors, GPIb-V-IX in synergy with integrin  $\alpha 2\beta 1$  mediating primary

adhesion, reinforced by platelet activation through GPVI, which in turn regulates thrombus formation.

Coagulation activation with tissue factor may contribute to collagen-induced thrombus formation. **Chapter 5** introduces an assay to trigger thrombin generation and coagulation in flow-adhesion experiments on collagen. Investigated was by which signaling pathway collagen-induced platelet activation interacts with tissue factor-triggered coagulation both *in vitro* and *in vivo*. In murine blood flowing over collagen, platelet exposure of PS and procoagulant activity, but not adhesion, completely relied on each of the following signaling modules: GPVI, the FcR  $\gamma$ -chain, Src kinases, the adaptor protein LAT, and PLC $\gamma$ 2. Upon flow in the presence of tissue factor, these signaling components were essential for platelet aggregation and greatly enhanced the formation of fibrin clots. The physiological importance of this GPVI pathway was shown in a FeCl<sub>3</sub>-induced *in vivo* murine thrombosis model. In both venules and arterioles, the presence and activity of GPVI, FcR  $\gamma$ -chain and Src kinases resulted in an enhanced formation of PS-exposing and fibrin-rich thrombi. These findings demonstrate that the GPVI-PLC $\gamma$ 2 activation pathway can regulate collagen-dependent coagulation in venous and arterial thrombus formation.

In **chapter 6**, the mutually stimulatory processes of platelet activation and thrombin generation in arterial and venous thrombus formation *in vivo* were investigated in more detail. In the murine FeCl<sub>3</sub> model, the thrombus-forming process appeared to be triggered by both collagen exposure and complex formation of tissue factor and factor VII(a). Interestingly, mild thrombin inhibition or platelet inhibition suppressed arterial thrombus formation, while strong thrombin inhibition or mild thrombin inhibition in combination with platelet inhibition was necessary to suppress venous thrombosis. Thrombus formation in both vessel types was characterized by the presence of PS-exposing platelets, as detected with fluorescently labeled annexin A5. Shielding of exposed PS by injection of a surplus of unlabelled annexin A5 abolished the formation of both arterial and venous thrombi, while a mutant M1234-annexin A5 was ineffective. Surprisingly, decreased anticoagulant activity in mice carrying the factor V Leiden mutation had no more than little effect. Together, these findings demonstrated that the propagation of thrombin generation by PS-exposing platelets is a key regulatory process in both veins and arteries. Since platelet-dependent thrombin generation is most active in venous thrombus formation, this process may be a clinically relevant target for antithrombotic therapy.

As indicated, platelets play a dual role in thrombus formation by assembling into aggregates and by stimulating the coagulation. In **chapter 7** we investigated the

commitment of platelets to either of these functions both *in vitro* and *in vivo*. High-resolution two-photon fluorescence microscopy revealed that during thrombus formation under flow, fibrin(ogen)-binding platelets assembled into separated aggregates, after which distinct patches formed of non-aggregated platelets, exposing PS. The latter platelet population had inactivated  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  integrins and displayed increased binding of coagulation factors. Coated platelets, expressing serotonin binding sites, were not identified as a separate population. Thrombin generation (coagulation) favored the integrin inactivation and the transformation into PS-exposing platelets with reduced adhesion. Prolonged tyrosine phosphorylation *in vitro* resulted in secondary down-regulation of active  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ . Together, these results lead to a new, spatial model of thrombus formation, in which aggregated platelets ensure thrombus stability, while distinct patches of non-aggregated platelets effectuate procoagulant activity and generate thrombin and fibrin. Herein, the haemostatic activity of a developing thrombus seems to be determined by a balance in formation of proaggregatory and procoagulant platelets. This balance likely influences the efficacy of antiplatelet or anticoagulant medication.

The significance of the findings described in this thesis is discussed in **chapter 8**, particularly in the light of relevant, recent literature. In summary, the data recognize the GPVI pathway to PLC $\gamma$ 2 activation as a key signaling mechanism for  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent PS exposure and procoagulant activity. Signaling proteins that cluster together in the LAT signalosome, including the PI3K $\alpha$  and  $\beta$  isoforms support this pathway. Yet, only the population of platelets with prolonged  $\text{Ca}^{2+}$  elevation and tyrosine phosphorylation shows this procoagulant activity. Altogether, the key role of GPVI in the thrombus-forming process makes this platelet receptor as a promising new antithrombotic tool. However, the data also suggest that anti-GPVI treatment may be most effective in case of arterial thrombosis (low thrombin), rather than in case of venous thrombosis (high thrombin), since high thrombin formation can overrule the antithrombotic effect of anti-GPVI treatment. This knowledge may help to develop improved treatment strategies of the still numerous patients who suffer from cardiovascular thrombotic diseases.



# Samenvatting



Trombose, dat wil zeggen verstopping van de bloedvaten is nog steeds een van de meest voorkomende aandoeningen in onze samenleving. De medische wereld maakt daarbij onderscheid tussen veneuze trombose (zoals bijvoorbeeld een trombosebeen) en arteriële trombose (zoals bij een hart- of herseninfarct). Veneuze trombose is het gevolg van ongewenste bloedstolling, waarbij een fibrineprop gevormd wordt in de aders of venen. Arteriële trombose daarentegen is veelal het gevolg van schade van de bloedvatwand en daaropvolgende activering van de bloedplaatjes, die daarbij samenklonteren tot een plaatjesprop of plaatjesaggregaat. Veelal wordt veneuze trombose tegengegaan door stollingsremmers ('bloedverdunners'), terwijl arteriële trombose eerder onderdrukt wordt door medicatie die de plaatjesactivering remt (bijvoorbeeld aspirine). De laatste jaren is echter ook nagegaan, in hoeverre combinatietherapie met stollings- en plaatjesremmers effectief is ter preventie van trombose. Onderzoek met geïsoleerd bloed, met name in Nederland uitgevoerd, heeft laten zien dat de processen van stolling en plaatjesactivering heel nauw met elkaar verweven zijn. Trombine, dat een belangrijk product is van de stolling, is tevens een van de meest krachtige activatoren van plaatjes. Anderzijds zorgen geactiveerde plaatjes voor een oppervlak, waarop stollingsreacties kunnen plaatsvinden. Dit lijkt echter tegengesteld aan de verschillende functies van stolling (trombine) en geactiveerde plaatjes bij veneuze en arteriële trombose. Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is daarom na te gaan hoe de interacties tussen trombinevorming en plaatjesactivering afhankelijk zijn van de condities zoals die naar verwachting optreden tijdens veneuze en arteriële trombose.

Bloedplaatjes worden geactiveerd door een aantal ingewikkelde, trapsgewijs werkende signaleringsroutes, waarbij vele eiwitten betrokken zijn. Een algemeen overzicht van de routes, die relevant zijn voor dit proefschrift, is gegeven in **hoofdstuk 1**. Hier wordt het werkingsmechanisme uitgelegd van de receptor voor ADP, P2Y<sub>12</sub>, de trombinereceptoren PAR1 en PAR4, en de collageenreceptor glycoproteïne (GP)VI. Al deze receptoren activeren de zogenaamde fosfoinositide 3-kinase (PI3K) route, die zorgt voor de vorming van het signaleringslipide fosfoinositide-3,4,5-trifosfaat. Activering van PI3K door GPVI speelt een rol bij de rekrutering en activering van fosfolipase C- $\gamma$ 2 (PLC $\gamma$ 2) naar de plasmamembraan. Deze activering van PLC $\gamma$ 2 leidt tot een verhoging van het intracellulaire calcium, dat gemobiliseerd wordt vanuit interne opslagplaatsen. Een daaropvolgende stap is de calcium-afhankelijke expositie van het stollingsactieve fosfatidylserine (PS) op het plaatjesoppervlak. Gememoreerd wordt dat PS-exposerende plaatjes actief zijn in de generatie van trombine en het stimuleren van de stollingsactiviteit, doordat zij als bindingsplaats dienen van stollingsfactoren. Stimulering

van de plaatjes via de P2Y<sub>12</sub> en PAR receptoren leidt daarnaast tot activering van de Rap1b - PI3K - Akt route, die zorgt voor plaatjesaggregatie via activering van het integrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3.

Het zeer zeldzame syndroom van Scott is een milde bloedingsziekte, die gekenmerkt wordt door een verminderde expositie van stollingsactief PS op geactiveerde plaatjes en andere bloedcellen. De literatuur bevatte aanwijzingen dat de calciuminstroom als gevolg van interne calciummobilisatie verstoord is in plaatjes van Scott-patiënten. Aangezien dit een verklarende factor zou kunnen zijn voor de verminderde procoagulante respons van deze plaatjes, is in **hoofdstuk 2** onderzocht in hoeverre deze calciuminstroom daadwerkelijk veranderd is. In geïsoleerde plaatjes en geïmmortaliseerde B-cel lymfoblasten van twee verschillende Scott-patiënten zijn daarom metingen verricht aan zowel de calciuminstroom als de PS expositie. Er werden echter geen verschillen waargenomen tussen de cellen van Scott-patiënten en overeenkomstige cellen van controlepersonen. Wel was in Scott plaatjes de mate van PS expositie na GPVI stimulatie sterk gereduceerd. Deze resultaten weerleggen daarmee de veronderstelling dat een deficiëntie in calcium-sigitaaltransductie ten grondslag ligt aan het Scott syndroom.

Inositol-bevattende fosfolipiden, die voornamelijk geproduceerd worden door PI3K, spelen een rol bij de activering van plaatjes. Welke rol is nog niet helemaal duidelijk. **Hoofdstuk 3** beschrijft onderzoek naar de functie van verschillende PI3K isovormen in plaatjes na activering met collageen of trombine. Voor dit onderzoek werd gebruik gemaakt van muizen, die deficiënt waren in ofwel de p85 $\alpha$  regulerende subunit (klasse 1A PI3K) ofwel de p110 $\gamma$  katalytische subunit (klasse 1B PI3K), en verder van enkele nieuw ontwikkelde remmers van specifieke katalytische subunits. Wij konden aantonen dat zowel de p85 $\alpha$  als de katalytische p110 $\beta$  subunit bijdraagt aan de calciumsignaleringsroute en daaropvolgende PS expositie. In plaatjes gestimuleerd met collageen verloopt deze bijdrage via de klassieke calciumsignaleringsroute, dat wil zeggen door verhoging van PLC-afhankelijke calciummobilisatie en daarop volgende opslag-gemedieerde calciuminstroom. In tegenstelling tot de isovormen PI3K $\alpha$  en PI3K $\beta$  (beide klasse 1A), blijken de isovormen PI3K $\delta$  en PI3K $\gamma$  een minder belangrijke rol te hebben in dit proces.

Middels *in vitro* perfusieproeven, beschreven in **hoofdstuk 4**, is de rol van verschillende plaatjesreceptoren voor adhesieve eiwitten, namelijk het glycoproteïne Ib (GPIb) en integrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 als receptoren voor von Willebrand factor (vWF), en GPVI en integrine  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 als receptoren voor collageen, onderzocht bij de trombusvorming. Het

trombusvormende proces en de procoagulante activiteit zijn daarbij gemeten tijdens de stroming van humaan bloed over een collageenoppervlak onder een hoge afschuifsnelheid (*shear rate*). Gebruik werd gemaakt van nieuw ontwikkelde antilichamen en peptiden gericht tegen collageenreceptoren, teneinde de specifieke functie van elke receptor te ontrafelen. Gebleken is dat GPVI essentieel is voor de vorming van plaatjesaggregaten, de calciumsignalerings- en de PS-expositie. Anderszins speelt GPVI geen rol in de primaire adhesie van plaatjes aan het collageen/vWF-oppervlak. Integrine  $\alpha 2\beta 1$  heeft slechts een modulerende rol in de calciumsignalerings-, plaatjesaggregatie- en PS-expositie, doordat het de werking van GPVI versterkt. De glycoproteïnen GPIb en  $\alpha 2\beta 1$  overlappen elkaar gedeeltelijk in primaire adhesie. Co-inhibitie van ADP- en collageenreceptoren geeft een sterk verminderde adhesie en aggregatie. Om complete remming van de trombusvorming te krijgen moet echter zowel GPVI als GPIb of  $\alpha 2\beta 1$  geblokkeerd worden. Op basis van deze resultaten konden wij concluderen, dat de plaatjesadhesie en -aggregatie op collageen bepaald worden door onderlinge samenwerking van de verschillende adhesieve receptoren: GPIb in synergie met  $\alpha 2\beta 1$  voor de primaire adhesie, welk in een proces dat versterkt wordt door GPVI leidt tot trombusvorming.

Op grond van de literatuur werd aangenomen dat activering van de stolling middels weefselfactor betrokken is bij de collageen-afhankelijke trombusvorming. **Hoofdstuk 5** beschrijft een nieuwe methode om trombinegeneratie en stolling op te wekken, door bloed onder stromingscondities over collageen te leiden. Deze methode is gebruikt om de vraag te beantwoorden via welk signaleringspad de plaatjesactivering door collageen bijdraagt aan de stolling onder invloed van weefselfactor. In muizenbloed dat geperfundeed werd over collageen bleek de expositie van PS, maar niet de plaatjesadhesie, volledig afhankelijk van de volgende signaleringsmodules: GPVI, de FcR $\gamma$ -keten, Src-kinases, het adaptor eiwit LAT en PLC $\gamma 2$ . In aanwezigheid van weefselfactor waren deze signaleringscomponenten essentieel voor de plaatjesaggregatie en droegen zij bij aan de vorming van fibrinestolsels. De fysiologische betekenis van dit GPVI-signaleringspad werd onderzocht in een *in vivo* trombosemodel in muizen. Hierbij werd trombose opgewekt na vasculaire beschadiging met behulp van ijzertrichloride (FeCl<sub>3</sub>). In de microscopische arteriën en venen van het darmvlies resulteerde de afwezigheid van actief GPVI, FcR $\gamma$ -keten of Src-kinases in een sterk verlaagde vorming van PS-exponerende en fibrinerijke trombi. Deze bevindingen geven aan dat de activeringsroute van GPVI naar PLC $\gamma 2$  van belang is voor het trombusvormende proces, inclusief stolling en fibrinevorming onder arteriële en veneuze stromingscondities.

De interactie tussen plaatjesactivering en trombinegeneratie in arteriële en veneuze trombusvorming *in vivo* is onderzocht in **hoofdstuk 6**. In hetzelfde FeCl<sub>3</sub> trombosemodel bleek dat de trombusvorming op gang werd gebracht door vasculaire blootstelling van zowel collageen als weefselfactor. De trombusvorming in arteriën kon worden onderdrukt door plaatjesremming of door lage dosering van een trombineremmer. Echter in venen kon de trombusvorming alleen onderdrukt worden door een combinatie van beide remmers, of door een hoge dosis van de trombineremmer. De procoagulante respons van bloedplaatjes verdween na infusie van annexine A5, een eiwit dat bindt aan PS. Wanneer annexine A5 vooraf aan muizen toegediend werd, resulteerde dit in een complete remming van de trombusvorming in beide typen bloedvaten. Dat er inderdaad procoagulante bloedplaatjes aanwezig zijn in de arteriële en veneuze trombi werd bevestigd door deze *in vivo* aan te kleuren met fluorescerend annexine A5. Verrassend genoeg had verlaagde antistollingsactiviteit in muizen met een factor V Leiden-mutatie slechts een klein effect op het tromboseproces. Samen laten deze resultaten zien dat de versterking van trombinegeneratie door PS-exposerende plaatjes van belang is voor het trombotische proces in venen en arteriën. Aangezien PS-afhankelijke trombinegeneratie het meest actief lijkt bij de veneuze trombusvorming, kan deze plaatjesreactie een doelwit zijn voor nieuwe antitrombotische therapie.

Zoals eerder aangegeven hebben plaatjes een tweeledige rol in het proces van trombusvorming, namelijk door vorming van aggregaten en door stimulering van de bloedstolling. In **hoofdstuk 7** onderzochten wij welke van deze twee functies plaatjes vertonen na activering onder *in vitro* of *in vivo* condities. Hoge resolutie tweefoton fluorescentie-microscopie liet zien dat tijdens de trombusvorming een groot aantal fibrinogeen-bindende plaatjes clusterde tot aggregaten, terwijl een andere groep van niet-aggregerende plaatjes PS exposeerde. Deze laatste plaatjespopulatie bleek in versterkte mate stollingsfactoren te binden, terwijl hun  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  integrines in een niet-actieve conformatie waren. Zogenaamde 'coated' plaatjes, die gekarakteriseerd zijn door een expressie van serotonine bindingsplaatsen, vormden geen aparte populatie. Interessant is dat de vorming van trombine (stolling) de inactivering van integrines bevorderde en ook zorgde voor een verhoogde transformatie van plaatjes tot losse, PS-exposerende cellen. De secundaire inactivering van  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  integrines kon herleid worden tot een verlengde fosforylering van tyrosines middels proteïne tyrosinekinasen. Samengevat resulteren deze resultaten in een nieuw, ruimtelijk model van trombusvorming, waarbij clusters van geaggregeerde plaatjes zorgen voor trombusstabiliteit, terwijl andere, niet-aggregerende plaatjes zorgen voor de

procoagulante activiteit en de vorming van trombine en fibrine. Verondersteld wordt dat de hemostatische activiteit van een zich ontwikkelende trombus een resultante is van de balans in vorming van proaggregerende en procoagulante plaatjes. Deze balans is waarschijnlijk van belang voor de werkzaamheid van antiplaatjes- en antistollingsmedicatie.

**Hoofdstuk 8** beschrijft het belang van de bevindingen van dit proefschrift in het licht van relevante, recente literatuur. Aangegeven is dat de GPVI route naar PLC $\gamma$ 2 activering van groot belang is voor calcium-afhankelijke PS expositie en de procoagulante activiteit van plaatjes. Diverse signaleringseiwitten die samenklonteren in het LAT signalosoom zijn betrokken bij het ontstaan van deze procoagulante activiteit, inclusief de PI3K $\alpha$  en  $\beta$  isovormen. De cruciale rol van het GPVI signaleringspad in het trombusvormende proces maakt de GPVI receptor tot een veelbelovend doeleiwit voor nieuwe antitrombotische middelen. Het is daarbij te verwachten dat anti-GPVI behandeling het meest effectief zal zijn bij de preventie van arteriële trombose (laag trombine) en minder effectief bij de veneuze trombose (hoog trombine). Immers een hoge trombinevorming zal het antitrombotische effect van een anti-GPVI behandeling ongedaan kunnen maken. De in dit proefschrift beschreven kennis zal hopelijk bijdragen tot de ontwikkeling van nieuwe behandelingsmethoden voor de nog zeer vele trombosepatiënten.